

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791061

研究課題名（和文）肺線維化における制御性B細胞の役割の検討

研究課題名（英文）The role of regulatory B cells in lung fibrosis model

研究代表者

濱口 儒人（HAMAGUCHI YASUHIRO）

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：60420329

研究成果の概要（和文）：

肺線維化におけるB細胞の役割は明らかではない。抗CD20抗体を事前に投与してB細胞を除去したマウスにブレオマイシンを投与したところ、コントロール抗体を投与したマウスに比べ肺線維化は増悪した。遺伝的にB細胞を欠損したマウスにブレオマイシンを投与したところ野生型マウスに比べ肺線維化は増悪したが、事前に野生型マウスの制御性B細胞を移入したところ肺線維化は野生型マウスと同程度まで軽減した。以上より、肺線維化の発症期においてB細胞は抑制的に働いていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Pathogenesis of pulmonary fibrosis remains unclear. B cell depletion before the induction of lung fibrosis substantially exacerbated disease symptoms. Similarly, pulmonary fibrosis was also significantly worse in genetically B cell-deficient μ MT mice when compared with wild type mice. The adoptive transfer of wild type regulatory B cells into μ MT mice before disease initiation significantly reduced pulmonary pathology in μ MT mice. By contrast, B cell depletion during the inflammatory phase of pathology dramatically suppressed disease symptoms. Thus, B cells have important regulatory and pathogenic roles during the development of lung fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：制御性B細胞、肺線維症

1. 研究開始当初の背景

B細胞は従来、主に抗体産生細胞としての側面から研究が進められてきたが、近年、B細胞には抗体産生以外に抗原提示能やサイトカイン産生、T-B細胞相互作用があることが明らかになってきた。B細胞の中の一部に

IL-10を特異的に産生する亜集団があり、このB細胞は炎症反応を制御する機能を有していることから制御性B細胞（regulatory B細胞）と呼ばれており、 $CD5^+CD1d^{high}B220^+$ の表現型を有している。全身性強皮症（systemic sclerosis, SSc）は皮膚

および内臓諸臓器の線維化をきたし、高率に自己抗体が検出されることから自己免疫疾患に位置づけられている。肺線維症はSScにおいてその予後を規定する重篤な内臓合併症の一つであるが、現在までに有効な治療法は開発されておらず、B細胞の役割についても一定の見解はない。

抗CD20抗体によるB細胞除去療法が関節リウマチや全身性エリテマトーデスをはじめとする自己免疫疾患に有用であると報告されている。しかしながら、肺線維症におけるCD20抗体療法の効果についてはこれまで検討されていない。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では以下の2点、すなわち(1)ブレオマイシン誘発肺臓炎におけるB細胞とくに制御性B細胞の役割、(2)肺線維化に対するCD20抗体療法の効果、について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

①肺における制御性B細胞の同定とサイトカイン産生

マウスの肺組織を採取しリンパ球を分離し、蛍光標識したB220、CD5、CD1dに対する抗体を用いて免疫染色を行う。フローサイトメトリーを用いて制御性B細胞(B220⁺CD5⁺CD1d^{high})の同定を試みる。マウス肺で制御性B細胞が同定できた場合、これらの細胞がIL-10を産生するかどうか、*in vitro*の環境下でLPS、PMA、イオノマイシン、モネンシンを添加して培養し、IL-10の細胞内染色を行うことで検討する。

②CD20抗体療法の制御性B細胞に対する効果

野生型マウスに250 μ gの抗CD20抗体あるいはコントロール抗体を投与し、抗体投与7日後に肺、末梢血、骨髄、リンパ節、脾臓、腹腔内からリンパ球を採取する。制御性B細胞および通常のB細胞数を抗CD20抗体投与群とコントロール抗体投与群と比較し、CD20抗体療法が制御性B細胞を除去するか(とくに肺組織において)について検討する。

③肺線維症の発症におけるB細胞の役割の検討

ブレオマイシン投与7日前に250 μ gの抗CD20抗体あるいはコントロール抗体を野生型マウスに投与し、B細胞を除去した状態でブレオマイシンを投与して肺線維症を誘発する。ブレオマイシン投与14日後に肺を採取し、線維化の程度を抗CD20抗体投与群とコントロール抗体投与群との間で比較する。この実験から、肺線維症の発症におけるB細胞の役割を検討することができる。

④CD20抗体療法の肺線維症炎症期に対する効果の検討

ブレオマイシン投与3日後の野生型マウスに250 μ gの抗CD20抗体あるいはコントロール抗体を投与し、ブレオマイシン投与14日後における肺線維化を抗CD20抗体投与群とコントロール抗体投与群との間で比較する。この実験から、肺線維症の炎症期におけるCD20抗体療法の効果を検討することができる。

⑤制御性B細胞が肺線維症の発症を抑制するかの検討

野生型マウスの脾臓から採取したリンパ球からフローサイトメトリーを用いて制御性B細胞(B220⁺CD5⁺CD1d^{high}B細胞)と非制御性B細胞(通常のB細胞、non-B220⁺CD5⁺CD1d^{high}B細胞)を分離し、B細胞が欠損したマウス(mMTマウス)に移入する。制御性B細胞を移入したマウスと通常のB細胞を移入したマウスにブレオマイシンを投与し誘発される肺の線維化を評価する。

⑥ブレオマイシン誘発肺臓炎における浸潤細胞の検討

実験④⑤において、ブレオマイシンを投与した7日後に各群のマウスから肺を採取し、CD20抗体療法が浸潤細胞に及ぼす影響について検討する。浸潤細胞として、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD19⁺B細胞、CD14⁺マクロファージなどを検討対象とする。さらに、浸潤細胞が産生するサイトカインについても検討する。

4. 研究成果

①肺における制御性B細胞の同定

マウスの肺組織からリンパ球を分離し、蛍光標識した抗体を用いて免疫染色を行いフローサイトメトリーで検討した。脾臓や腹腔内と同様、マウス肺にはB220⁺CD5⁺の表現型を有し、IL-10を産生するB細胞亜種団が存在していた。これらの細胞は制御性B細胞と考えられ、脾臓や腹腔内と同様、肺にも制御性B細胞が存在していることが明らかになった。

②CD20抗体療法の制御性B細胞に対する効果

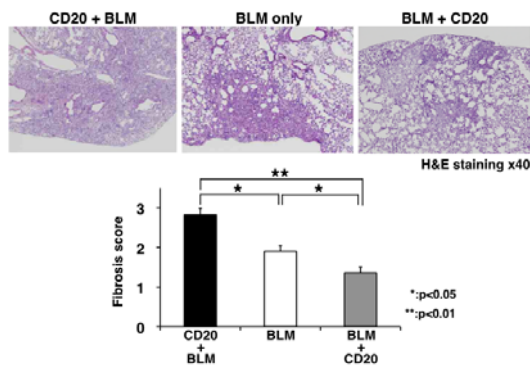
野生型マウスに250 μ gの抗CD20抗体あるいはコントロール抗体を投与し、抗体投与7日後に肺、末梢血、骨髄、リンパ節、脾臓、腹腔内におけるB細胞数検討した。抗CD20抗体投与群ではコントロール抗体投与群と比較し、制御性B細胞を含むB細胞分画は著明に減少していた。

③肺線維症の発症におけるB細胞の役割の検討

ブレオマイシン投与 7 日前に 250 μ g の抗 CD20 抗体あるいはコントロール抗体を野生型マウスに投与し、B 細胞を除去した状態でブレオマイシンを投与して肺線維症を誘発した。ブレオマイシンを投与する 7 日前に抗 CD20 抗体を投与して事前に B 細胞を除去したマウス (CD20+BLM) では、コントロール抗体を投与したマウス (BLM) に比べ肺の線維化は増悪していた。したがって、B 細胞は肺線維症の発症期に炎症を抑制する作用があることが示唆された。

④CD20 抗体療法の肺線維症炎症期に対する効果の検討

炎症期であるブレオマイシン投与 3 日後に抗 CD20 抗体を投与したマウス (BLM+CD20) ではコントロール抗体を投与したマウス (BLM) に比べ肺の線維化は改善していた。組織学的に評価した線維化スコアでも同様の結果が得られた。したがって、肺線維症の炎症期では B 細胞は炎症を促進する役割があることが示唆された。



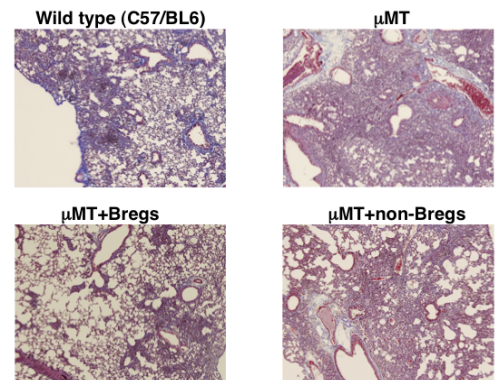
⑤制御性 B 細胞が肺線維症の発症を抑制するかの検討

遺伝的に B 細胞を欠損した μ MT マウスにブレオマイシンを投与したところ、野生型マウスに比べ肺の線維化は増悪していたが、ブレオマイシンを投与する 1 日前に野生型マウスの制御性 B 細胞 ($B220^+CD5^+CD1d^{high}$ B 細胞) 分画を経静脈的に移入した μ MT マウスでは、制御性 B 細胞分画を移入しなかった μ MT マウスに比べ肺の線維化は野生型マウスと同程度まで改善していた。一方、非制御性 B 細胞 (通常の B 細胞, $B220^+CD5^{low}CD1d^+$ B 細胞) 分画を移入した μ MT マウスでは肺の線維化は改善しなかった。したがって、制御性 B 細胞は肺線維症の発症期において炎症を抑制する役割があることが示唆された。

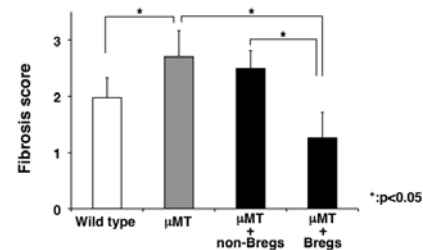
⑥ブレオマイシン誘発肺臓炎における浸潤細胞の検討

実験③④において、ブレオマイシンを投与した 7 日後に各群のマウスから肺を採取し、

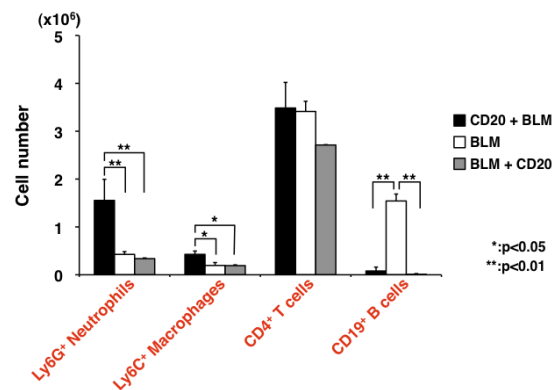
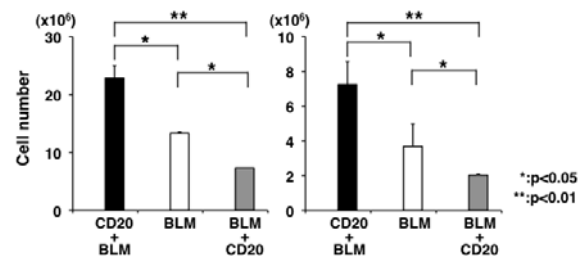
CD20 抗体療法が浸潤細胞に及ぼす影響について検討した。抗 CD20 抗体を用いた B 細胞除去療法は好中球やマクロファージをはじめとする炎症細胞浸潤に影響を与えており、線維化の程度は浸潤した好中球数とマクロファージ数と相関していた。また、線維化の程度と M1 マクロファージ、M2 マクロファージ数が相関していた。以上の結果から、制御性 B 細胞は好中球やマクロファージをはじめとする炎症細胞浸潤をコントロールして肺の線維化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

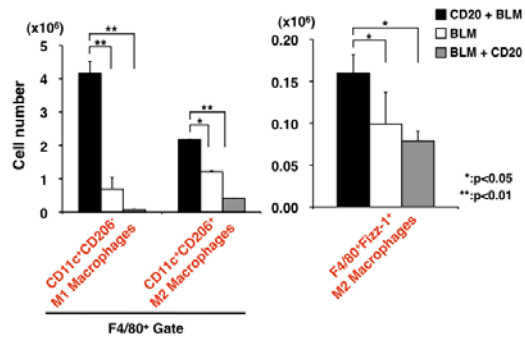


Masson Trichrome staining x40



Total cells F4/80⁺ Macrophages





5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

① Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Tedder TF, Takehara K, Fujimoto M: A dual role of B cells in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis model. 第 36 回日本研究皮膚科学会学術大会・総会, 国立京都国際会議場 (京都), 2011.12.9

② Hamaguchi Y, Tedder TF, Fujimoto M: B cells have a dual effect on pulmonary fibrosis induced by bleomycin in a mouse model. IMMUNOLOGY 2011 annual meeting of The American Association of Immunologists, San Francisco Moscone Convention center (アメリカ), 2011.5.14

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱口 儒人 (HAMAGUCHI YASUHITO)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：60420329

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし